



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 199 56 503 A 1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

**A 61 L 24/00**

A 61 L 27/50

(21) Aktenzeichen: 199 56 503.1  
(22) Anmeldetag: 24. 11. 1999  
(43) Offenlegungstag: 21. 6. 2001

(71) Anmelder:

Universitätsklinikum Freiburg, 79106 Freiburg, DE

(74) Vertreter:

Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

(72) Erfinder:

Schaefer, Dirk Johannes, Dr., 79102 Freiburg, DE;  
Kiefer, Thomas, 79117 Freiburg, DE; Stark, Gerhard  
Björn, Prof. Dr., 79874 Breitnau, DE

(56) Entgegenhaltungen:

DE	34 25 182 C2
DE	199 62 090 A1
DE	198 12 714 A1
DE	198 05 673 A1
DE	42 19 321 A1
WO	97 14 376 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Spritzbares Knochenersatzmaterial

(57) Die Erfindung betrifft ein Knochenersatzmaterial, das eine weiche Matrix, lebende Zellen und eine aushärtende Matrix umfaßt. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines derartigen Knochenersatzmaterials und die Verwendung von nicht-keramischen Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials. Dieses kann in einem die Erfindung betreffenden geeigneten Spritzapparat minimal-invasiv in einen Knochendefekt injiziert werden.

# DE 199 56 503 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Knochenersatzmaterial enthaltend lebende Zellen und eine aushärtende Matrix. Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur Herstellung eines derartigen Knochenersatzmaterials sowie die Verwendung von Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines lebende Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials und deren Anwendung in einem geeigneten Spritzapparat.

Bei zahlreichen Knochendefekten ist es wünschenswert, ein Knochenersatzmaterial zur Verfügung zu haben, mit dem diese Defekte aufgefüllt werden können. Beispiele für derartige Defekte sind im Kieferbereich Parodontose oder Atrophien, im Handbereich Defekte nach Knochentumorresektionen und Traumata und Defekte der Wirbelsäule, des Schädels und der Röhrenknochen, beispielsweise bei Osteoporosefrakturen und Tumorresektionen.

Im Stand der Technik sind verschiedene Knochenersatzmaterialien bekannt. Knochenersatzmaterialien, die verformt werden können, werden oft als "injizierbarer Knochen" bezeichnet. Bisherige Lösungen unter diesem Begriff beinhalten entweder Hydrogele mit knochenbildenden Zellen, Hydrogele mit osteoinduktiven Proteinen oder Polymere, die sich *in situ* verfestigen, mit oder ohne osteoinduktiven Faktoren. Jede dieser Lösungen hat spezifische Nachteile.

Entweder enthalten die Materialien keine knochenbildenden Zellen, sie können also nicht osteogen wirken. In der Regel wird ein Biomaterial oder Knochenzement als homogene Plombe in einen Knochendefekt gespritzt, die nicht mehr resorbierbar und durch Knochen ersetztbar ist. Unter mechanischen Belastungen kommt es zur Ermüdung und zum Bruch des Implantats. Materialien, die Zellen enthalten, weisen zwar potentielle Osteogenität auf, besitzen aber keine Sekundärstabilität. Diese Materialien, meist in Form von Hydrogelen, können auch nicht geformt werden und haben keine Primärstabilität. Polymere, die *in situ* aushärten, wirken oft toxisch auf die Zellen. Die US-Patentschrift 5,914,121 offenbart eine Zusammensetzung zur Implantation in ein Säugetier umfassend Fibroblasten, Hydroxylapatit-Pulver und Fibrin. Diese Zusammensetzung weist keine Sekundärstabilität auf, weil sich das Material nach Implantation nicht verfestigt, sondern weiter verformbar ist. Grund dafür ist, daß keramisches Hydroxylapatitpulver verwendet wird. Diese Zusammensetzung härtet nicht aus. Im Stand der Technik gibt es kein Knochenersatzmaterial, das lebende Zellen enthält und somit osteogen wirken kann und zugleich ausreichende Sekundärstabilität bereitstellt.

Es besteht also ein dringendes Bedürfnis nach einem vorteilhaften Knochenersatzmaterial.

Die Aufgabe wurde gelöst durch das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial, das eine weiche Matrix, lebende Zellen und eine aushärtende Matrix umfaßt.

Das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial weist eine hervorragende Primär- und die Sekundärstabilität auf. Unter der Primärstabilität (auch "primäre Plastizität") eines Knochenersatzmaterials wird die Stabilität einer Zusammensetzung zum Zeitpunkt der Applikation verstanden. Das Knochenersatzmaterial der vorliegenden Erfindung ist plastisch verformbar und kann in konkrete dreidimensionale Formen gebracht werden, je nach den anatomischen Erfordernissen. Das Material ist also nicht zu "flüssig", da sich dann keine plastischen Gebilde würden formen lassen. Es ist aber auch nicht zu starr, im Extremfall sogar völlig erhärtet, da es dann nicht den Gegebenheiten des Falles einfach angepaßt werden könnte und da derartige "harte" Implantate in der Regel keine osteogenen Komponenten enthalten könnten. Unter Sekundärstabilität ist die Stabilität des Implantats nach dem Eingriff zu verstehen. Das Knochenersatzmaterial der Erfindung behält nach dem Aushärten langfristig die dreidimensionale Form, die ihm verliehen wurde. Es ist druckstabil. Dies wird dadurch erreicht, daß das erfindungsgemäße Material, das zuvor entsprechend geformt worden ist, in relativ kurzer Zeit vollständig aushärtet.

Die weiche Matrix gewährleistet das Überleben der Zellen, ihre Migration und Organisation in der Matrix und ihre Differenzierung zu knochenbildenden Osteoblasten. Eine weitere Funktion der weichen Matrix ist, daß sie zur Primärstabilität des Materials, also zur anfänglichen Formbarkeit, beiträgt. Die weiche Matrix ist vorzugsweise eine Fibrinsuspension, die aus einer Fibrinogenlösung hergestellt werden kann. Dies wird vorzugsweise durch Zugabe einer Thrombinhaltigen Lösung in Gegenwart von Calcium erreicht. Vor Zugabe des Thrombins kann die Fibrinogenlösung zur Stabilisierung des später entstehenden Fibrins durch  $\epsilon$ -Aminocapronsäure angereichert werden. Die weiche Matrix kann gegebenenfalls angereichert sein mit Chondroitinsulfat, Proteoglykanen, Sialoproteinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren. Beispiele für Wachstumsfaktoren, die zum Einsatz kommen können, sind bFGF, PDGF, VEGF, Bone Morphogenic Protein, TGF- $\beta$  und weitere bekannte Faktoren. Nukleinsäuren, die die Wachstumsfaktoren oder Hormone kodieren, können ebenfalls in der weichen Matrix enthalten sein, vorzugsweise in Form von Plasmiden. Ergänzend können weitere visköse, gelierende und sich verfestigende Gele verwendet werden, wie zum Beispiel biologische Kollagengele, Gelatine, Alginat, Agarose, Polysaccharide, synthetisches Kollagen, Hydrogele oder visköse Polymere.

Bei den lebenden Zellen des erfindungsgemäßen Knochenersatzmaterials handelt es sich vorzugsweise um Osteoblasten oder Vorläuferzellen von Osteoblasten. Diese können durch kleine Knochenbiopsien des Beckens, Brustbeins, des Schädels oder Kiefers oder von Röhrenknochen gewonnen werden. Alternativ zu Knochenproben können auch Aspirate von Knochenmark aus dem Becken und aus dem Brustbein verwendet werden. Gegebenenfalls können die gewonnenen Zellen *in vitro* kultiviert und vermehrt werden. Vorteilhafterweise enthält das Knochenersatzmaterial auch gefäßbildende Zellen, wie zum Beispiel Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen.

Erfindungsgemäß handelt es sich bei den Zellen entweder um solche, die von dem Patienten selbst stammen (autologe Zellen) oder um Zellen bzw. Zelllinien, die von dem Empfänger toleriert werden. Beispiele hierfür sind embryonale Stammzellen sowie allogene mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, stromale Zellen oder Osteoblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, bzw. deren Vorläuferzellen. Ebenfalls können autogene mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, stromale Zellen oder Osteoblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, bzw. deren Vorläuferzellen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Material umfaßt auch eine erhärtende Matrix. Dadurch verfestigt sich das Material innerhalb einer bestimmten Zeit zu einer stabilen Zusammensetzung. Bevorzugt verfestigt sich die Zusammensetzung innerhalb einer Stunde, am bevorzugtesten innerhalb von 15 Minuten. Das Knochenersatzmaterial weist eine pastöse Konsistenz auf, wodurch die Primärstabilität bereitgestellt wird. Dies bedeutet, daß das Material leicht an eine bestimmte Form angepaßt oder in eine bestimmte Form gebracht werden kann. Die Primärstabilität wird vorteilhafterweise durch die in der Zusammensetzung enthaltenen Fibrinstränge bereitgestellt. Die erhärtende Matrix ist für die Sekundärstabilität verantwortlich.

# DE 199 56 503 A 1

Das bedeutet, daß die Zusammensetzung nach dem Erhärten nicht mehr verformbar ist, sondern Druckfestigkeit aufweist.

Vorzugsweise verbindet sich die erhärtende Matrix durch Kristallisation zu Hydroxylapatit. Die feste Matrix kann durch anorganische Verbindungen z. B. aus kristallinen oder amorphen Calciumphosphaten (Tetracalciumphosphat, d- oder e-Tricalciumphosphat, Dicalciumphosphat oder Dicalciumphosphatdihydrat) hergestellt werden. Vorzugsweise finden fertige sog. nicht-keramische Knochenzemente aus Kombinationen dieser Calciumphosphatverbindungen Anwendung (z. B. BoneSource®, Fa. Leibinger; Norian SRS®, Fa. Synthes-Stratec, USA; Biobone®, Fa. Merck, Darmstadt). Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie eine röntgenspektrometrische Diffraktion ähnlich dem der mineralischen Phase des Knochens haben, sich endothermal bei Körpertemperatur von 37°C in 10–15 Minuten zu mikroporösem Calciumphosphatzement durch Kristallisation verbinden, injizierbar sind, eine Druckstabilität (ca. 60 MPa) größer oder gleich der von normalem Knochen aufweisen, chemische Verbindungen zum Empfängerknochen eingehen und als osteoinduktive Leitschiene fungieren können.

Calciumphosphatzement wird *in vivo* langsam resorbiert (ca. 35% in den ersten 12 Monaten). Das bevorzugteste Material der sich erhärtenden Matrix ist nicht-keramischer Hydroxylapatit-Zement. Einige Eigenschaften von Hydroxylapatit-Zement sind in Costantino P. D. et al. (1991) Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery 117, 379 angegeben. Hydroxylapatit-Zement weist wesentliche Unterschiede zu sogenanntem keramischen Hydroxylapatit auf, welcher häufig in der klinischen Praxis verwendet wird. Hydroxylapatit-Zement verbindet sich erst durch direkte Kristallisation zu Hydroxylapatit. Die Bestandteile von Hydroxylapatit-Zement reagieren in wäßriger Umgebung zu Hydroxylapatit. Unter *in vitro*-Bedingungen bei 37° bindet reiner Hydroxylapatit-Zement in etwa 15 Minuten ab.

Um die Spritzbarkeit bzw. die mechanischen Eigenschaften zu verändern, können den Calciumphosphaten weitere Verbindungen zugegeben werden, wie z. B. Natriumchlorid-Lösung, Milchsäure, Glycerol, Chitosan, Natriumglycerolphosphat, Propylenfumarat oder bioaktive Proteine.

Auch andere Materialien, wie Poly-Glykol-Milchsäure (Polyglycolic-lactid-acid, PGLA), können ebenfalls eingesetzt werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Knochenersatzmaterials, das die folgenden Merkmale umfaßt:

- a) Bereitstellung von lebenden Zellen,
- b) Mischen der lebenden Zellen mit einer Zusammensetzung, die Bestandteile zur Bildung einer weichen Matrix enthält,
- c) Mischen der lebenden Zellen mit einer Zusammensetzung, die ein aushärtendes Material enthält.

In einer Ausführungsform des Verfahrens werden die lebenden Zellen zunächst mit der Zusammensetzung gemischt, die Bestandteile zur Bildung einer weichen Matrix enthält. Nach Bildung der weichen Matrix werden die darin eingebetteten lebenden Zellen mit der Zusammensetzung gemischt, die ein aushärtendes Material enthält.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Zellen um Vorläuferzellen von Osteoblasten, die durch kleine Knochenbiopsien des Beckens, Brustbeins des Schädels und Kiefers oder von Röhrenknochen gewonnen werden. Aus den Knochenproben wird das lose Stroma herausgespült und nach Zentrifugation in einer Kulturflasche ausplattiert. Feste Knochenbestandteile können ebenfalls in Kultur gebracht werden, da hieraus durch Migration weitere Zellen gewonnen werden können. Diese Technik führt zu einer deutlichen Beschleunigung der Zellgewinnung und einer höheren Effizienz der Ausbeute aus der gleichen Materialmenge. Die auswachsenden Zellen werden in der Regel im subkonfluenten Stadium gesplittet und durch zwei- bis dreifache Passagierung vermehrt. Als Alternative zu Knochenproben können auch Aspirate von Knochenmark aus Becken und aus Brustbein verwendet werden. Die Aspirate werden gewöhnlich in Heparinmedium gespült, durch Dichte-Gradientenzentrifugation einer Ficoll- oder Percollsäule von den roten Blutkörperchen getrennt und in einer Kulturflasche ausplattiert.

Vorzugsweise ist eine Lösung, die Bestandteile zur Bildung einer weichen Matrix enthält, eine Fibrinogen enthaltende Lösung. Die weiche Matrix entsteht dann, indem zur Fibrinogenlösung Thrombin zugesetzt wird. Herkömmlicher Fibrinkleber, beispielsweise Tissucole®, verfestigt sich aber zu einer festen Masse, in der sich Osteoblasten nicht mehr ausdehnen oder migrieren können; damit kann von den Osteoblasten auch keine extrazelluläre Matrix mehr synthetisiert werden.

Bevorzugt ist erfindungsgemäß die weiche Matrix so gestaltet, daß die Zellen sich noch ausdehnen und migrieren können, sowie daß sie auch die Anwesenheit einer erhärtenden Komponente überleben. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird humanes Fibrinogen in Osteoblasten-Kulturmedium oder physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gelöst und gegebenenfalls mit einer weiteren Verbindung, beispielsweise Capronsäure, stabilisiert, um eine schnelle enzymatische Fibrinolyse durch Proteininasen zu verhindern. Durch Zugabe von Thrombin in einer Calciumchloridlösung verfestigt und vernetzt sich das Fibrinogen zu Fibrinsträngen. Im Kulturmedium entsteht makroskopisch ein gallertartiges Material, welches in der histologischen Untersuchung mikroskopisch ein dreidimensionales, poröses Netzwerk aus Fibrinsträngen darstellt. Dieses Netzgewebe gewährleistet die Anheftung von Zellen, ihre Migration und dreidimensionale Organisation. Die Senkung der Thrombinkonzentration und die Lösung der Osteoblasten in dem Medium führen zu einer langsameren Formierung des Fibrins, so daß nicht ein homogener solider Clot, sondern vielmehr ein dreidimensionales Fibrinnetzwerk entsteht. Fibrinogen wird bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 100 mg/ml Medium eingesetzt, am bevorzugtesten von 50 bis 80 mg/ml Medium. Die bevorzugte Konzentration der Thrombinlösung ist 0,5 bis 1000 I.E./ml Calciumchloridlösung, die bevorzugteste Konzentration ist 1 bis 10 I.E./ml. Als Stabilisator kann  $\epsilon$ -Aminocapronsäure in einer Konzentration von 0,1 bis 10% zur Fibrinogenlösung zugegeben werden.

Vorzugsweise werden die Zellen nach Entfernen des Nährmediums in der oben beschriebenen Fibrinogenlösung suspendiert. Durch Zugabe einer Calciumchlorid-Thrombin-Lösung bildet sich das dreidimensionale Fibrinnetzwerk mit haftenden Osteoblasten im Kulturmedium oder physiologischer Kochsalzlösung. Dabei kann sich der osteoblastische Phänotyp mit dendritischen Zellausläufern bilden, ebenso wie interzelluläre Verbindungen zwischen den Zellen. Mit der

# DE 199 56 503 A 1

Zeit können die Zellen eine extrazelluläre Matrix um sich herum bilden, die später mineralisiert wird. Dabei erhalten die Zellen ihren üblichen Metabolismus und sterben nicht ab.

Die Zellsuspension wird erfahrungsgemäß auch mit einer Zusammensetzung gemischt, die ein aushärtendes Material enthält. Bevorzugte aushärtende Materialien sind oben bereits genannt worden. Sie finden auch bei dem erfahrungsgemäßen Verfahren Anwendung.

Die verschiedenen Komponenten wie Zellsuspension, Fibrinogen, Thrombin, erhärtende Substanz und weitere können vor dem Vermischen unterschiedlich in Lösungen kombiniert werden. So kann vor dem Mischvorgang Thrombin und Calciumchlorid der Lösung der erhärtenden Substanz beigemengt werden. Fibrinogen ist bevorzugt in der Zellsuspension vorhanden. Die Thrombinlösung kann aber auch eine separate Lösung sein. Die verschiedenen Komponenten können sukzessive miteinander vermischt werden. Vorzugsweise werden sie aber auf einmal miteinander gemischt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Komponenten unter GMP-Bedingungen in einer Mehrfachspritze bereitgestellt. Dem Anwender steht dann eine zur Injektion/Implantation fertige Apparatur und Masse zur Verfügung, die unter dem Spritzvorgang gemischt wird und damit den Abbindevorgang des Fibrinogens zu Fibrin und des Zementpulvers zu festem Knochenzement einleitet.

Beispielsweise kann in einer Doppelspritze mit einem Mündungsstück eine Spritze mit Calciumphosphatzementpulver in einer Calciumchloridlösung mit Thrombin aufgezogen werden. In der anderen Spritze wird Fibrinogenlösung mit suspendierten Osteoblasten (bevorzugt  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$ /ml) aufgezogen. In getrenntem Zustand sind die Komponenten ca. 10–15 Minuten haltbar. Durch Spritzen und Zusammenführen der beiden Komponenten in einem gemeinsamen Mündungsstück verbindet sich das Fibrinogen durch Thrombin in Anwesenheit von Calciumionen zu Fibrin. Der Calciumphosphatzement verfestigt sich innerhalb von 15–30 Minuten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine Dreifachspritze verwendet, die folgende Kompartimente enthält:

1. Die zentrale Spritze enthält eine wässrige Calciumphosphatzementlösung, gegebenenfalls mit folgenden Ergänzungen: Natriumchloridlösung, Milchsäure, Glycerol, Chitosan, Natriumglycerolphosphat, Propylenfumarat, bioaktive Proteine wie Thrombin, Wachstumsfaktoren, Hormone und/oder dafür kodierende Gene in geeigneten Vektoren.
2. Die seitliche Spritze 1 enthält eine Calciumchlorid-Thrombinlösung, gegebenenfalls mit folgenden Zusätzen: Chondroitinsulfat, Proteoglykane, Sialoproteine, Polysaccharide und/oder Wachstumsfaktoren.
3. Die seitliche Spritze 2 enthält eine Fibrinogenlösung und suspendierte Osteoblasten mit gegebenenfalls  $\epsilon$ -Aminocapronsäure.

Vorzugsweise kann auch eine Komplettspritze mit drei Kammern zur Anwendung kommen, wie sie in **Fig. 1** gezeigt ist. Durch synchrones Spritzen wird um einen Calciumphosphatzement-Strahl von 500–2500  $\mu\text{m}$  Durchmesser eine Osteoblasten-Fibrinmatrix gelegt, die in dreidimensionaler Form spongiösem Knochen entspricht.

Dem Fachmann ist klar, daß die Zusammensetzung auch in einer herkömmlichen Einkammer-Spritze appliziert werden kann, nachdem sie vorher aus den verschiedenen Lösungen bzw. Suspensionen durch Mischen hergestellt worden ist.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials.

Die vorliegende Erfindung stellt eine spritzbare, formbare und sich aushärtende Zusammensetzung pastöser Konsistenz zur Verfügung, die lebende, vorzugsweise autogene Zellen zur Knochenbildung enthält, die zum Schutz in einer biologischen Gelmatrix eingehüllt sind. Diese weiche Matrixkomponente gewährleistet zudem eine plastische Formbarkeit der Paste in konkrete dreidimensionale Formen und *in vivo* das Ausbreiten von synthetisierter Knochensubstanz als auch das Einsprossen von Blutgefäßen. Die aushärtende Matrix gewährleistet die Formstabilität und Druckfestigkeit des Konstrukts. Die bevorzugte Zusammensetzung aus Calciumphosphaten stimuliert die Osteoblasten zur Ausreifung und Synthese von extrazellulärer Knochenmatrix, für die sie die Calcium- und Phosphationen bereitstellt. *In vivo* führt das erfahrungsgemäße Material zur Knochenbildung aus sich heraus.

**Fig. 1** zeigt eine Dreikammerspritze, durch die das erfahrungsgemäße Knochenersatzmaterial gemischt und appliziert werden kann.

**Fig. 2** zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse eines MTS-Stoffwechseltests. Die Experimente sind in Beispiel 6 beschrieben. Das Ergebnis belegt, daß die Zellen in dem erfahrungsgemäßen Knochenersatzmaterial über einen beträchtlichen Zeitraum stoffwechselaktiv sind und überleben.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

## 55 Beispiel 1

### 1. Etablierung einer Osteoblastenkultur

Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, erstens die offene Knochenbiopsie (als Migrations- oder stromale Zellkultur) und zweitens die Aspiration von Knochenmark, die im folgenden dargestellt werden.

#### a) Knochenmarkbiopsie

Es werden sterile Knochenbiopsien in örtlicher Betäubung durch einen Hohlbohrer entnommen. Nach einem kleinen Hautschnitt werden Spongiosablöckchen von 0,5 bis 1  $\text{cm}^3$  entnommen, die Wunde wird verschlossen. Eine weitere Möglichkeit ist die Aspiration von ca. 15 ml Knochenmark.

Die Spongiosa sollte sehr schnell weiterverarbeitet werden und wenn möglich nicht länger als 12 Stunden im Transportgefäß bei 4°C lagern. Das Medium wird verworfen, die Spongiosa in die Petrischale gegeben und dort in 2 bis 3 mm

# DE 199 56 503 A 1

kleine Partikel (Chips) zerkleinert.

## aa) Migrationskultur

Es werden ca. 3 bis 4 Partikel in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte verteilt und mit 3 ml Medium aufgefüllt, bzw. 6 bis 7 Chips pro  $25 \text{ cm}^2$  mit 7 ml Medium. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5% CO<sub>2</sub>. Der Mediumwechsel sollte zweimal pro Woche erfolgen, wobei eine Inspektion unter dem Phasenkontrastmikroskop durchgeführt wird. Nach 5 bis 9 Tagen sind erste Zellen zu erkennen, nach 10 bis 14 Tagen ein subkonfluenter Zellayer mit 65 bis 75% Bodenflächenbedeckung.

5

## bb) Stromale Zellkultur (eigene Modifikation)

Zunächst wird der Knochen von Muskel-/Bindegewebsresten befreit. Die Spongiosa wird mit Schere und Pinzette in möglichst kleine Stückchen zerkleinert. Die Spongiosafragmente können (ohne Medium) in ein 50 ml-Falcon-Gefäß (ein Polypropylen-Schraubgefäß) gegeben und damit gewogen werden. Enthält das Material viel rotes Knochenmark, so kann man später pro 4 bis 6 g Spongiosa eine  $75 \text{ cm}^2$ -Kulturflasche bestücken. In das 50 ml-Falcon-Gefäß wird nun zur zerkleinerten Spongiosa ca. 25 ml Medium gegeben und durch Vortexen (hochfrequenter Rüttelvorgang, ca. 30 Sekunden, höchste Stufe) die Zellen herausgelöst. Der Überstand wird in andere 50 ml-Falcon-Gefäße überführt. Dieser Schritt wird wiederholt, bis das Medium nach Schütteln (Vortexen) nicht mehr trüb wird. Zuletzt kann noch eine Trypsin(-Collagenase)-Behandlung (ca. 10 Minuten,  $37^\circ\text{C}$ ) durchgeführt werden, um weitere Zellen zu gewinnen. Die erhaltenen Zellsuspensionen werden bei 250 g für 10 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Überstände werden verworfen und die Zellpellets in Medium resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt. Die gespülten Knochenstückchen können gegebenenfalls in einer separaten Kulturflasche zur Anzüchtung restlicher Zellen verwendet werden (nach Trypsinierung sollten diese aber gut mit Medium gespült werden).

15

Verbesserte Zellverteilung durch Auszählung der kernhaltigen Zellen:

20

Von der nach Resuspension der Zellpellets erhaltenen Zellsuspension werden 50 µl in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 46 µl Trypanblau gemischt. Anschließend folgt die Zugabe von 4 µl Essigsäure zur Lyse der Erythrozyten (Endkonzentration 4% Essigsäure). Die kernhaltigen Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Beispielsweise  $3 \times 10^5$  bis  $4 \times 10^5$  Zellen der Zellsuspension werden pro  $75 \text{ cm}^2$ -Kulturflasche verteilt.

25

Mediumwechsel findet erst nach 4 bis 5 Tagen statt, danach zweimal pro Woche.

30

Am zweiten Tag sind erste adhärente Zellen vorhanden, am vierten bis fünften Tag Klone. Die Subkonfluenz tritt meist zwischen dem neunten und dem elften Tag ein.

## b) Isolierung und Selektion der Knochenvorläuferzellen aus Knochenmarkaspirat

35

Bei örtlicher Betäubung wurde eine sterile Knochenmarkpunktion durchgeführt. Die Aspiration von 15 bis 20 ml Blut aus dem hinteren Beckenkamm wurde mit einer großvolumigen Kanüle und einer Heparin-benetzten Spritze durchgeführt. Danach wurde bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Zellpellet in 5 ml serumfreiem Medium resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde über einen Dichte-Gradienten (70% Percollsäule, Ficollgradient) einer Dichte-Zentrifugation unterzogen, die Mesenchymzellen wurden im Kulturgefäß ausplattiert und die Zellen durch Subkultivierung vermehrt.

40

## c) Nachweis des osteoblastischen Phänotyps

45

Der osteoblastische Phänotyp wird durch die knochenspezifischen Proteine Alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Kulturmedium (Ablauf) und durch immunhistochemische Färbungen von Kontrollkulturen nachgewiesen.

50

## Beispiel 2

### Herstellung eines Fibrinklebers

55

66 mg Fibrinogen werden in 1 ml Kulturmedium ( $\alpha$ MEM oder Medium 199 oder BGJ-B-Medium) ohne Serumzusatz mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst.  $\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure wird in einer Endkonzentration von 0,1 bis 10% der Fibrinogenlösung zugesetzt. 1,25 I.E. Thrombin werden in 40 µl Calciumchlorid-Lösung (40 mM) gelöst. Schließlich wird 1 ml der Fibrinogen-Lösung mit 60 µl Calciumchlorid-Thrombin-Lösung gemischt. Die Mischung wird dann in eine Kulturschale eingespritzt.

55

## Beispiel 3

### Herstellung einer Osteoblasten-Fibrinsuspension

60

Humane Osteoblasten und deren Vorläuferzellen werden aus einer Knochenmarkbiopsie gewonnen und ex vivo vermehrt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die subkonfluente Zellkultur in einer  $75 \text{ cm}^2$ -Kulturflasche wird mit 1 ml 0,025% Trypsin/EDTA-Lösung für 5 Minuten trypsinisiert. Die Zellsuspension wird in 2 ml Medium mit 10% FCS aufgenommen und 5 Minuten bei 1000 U/min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 µl Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl werden 20.000 Osteoblasten (Zellpassage 1 bis 3) in 200 µl Fibrinogenlösung aus Beispiel 2 suspendiert. Anschließend wird 60 µl der Calciumchlorid-Thrombin-Lösung aus Beispiel 2 zugegeben. Das Gemisch wird in eine Kulturschale oder in die Vertiefungen einer 48-Well-Platte gespritzt. Nach Zugabe von 760 µl Kulturme-

65

# DE 199 56 503 A 1

dium BGJ-B mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin werden die Zellen im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5 Im Lichtmikroskop zeigt sich nach 24 bis 72 Stunden bei 100-facher Vergrößerung die Ausbildung des osteoblastischen Phänotyps mit dendritischen Zellausläufern und nach 5 bis 12 Tagen der Aufbau von interzellulären Verbindungen der Zellen. Im Verlauf bilden die Zellen eine extrazelluläre Matrix um sich, die später mineralisiert wird. Die Vitalität der Zellen kann durch Trypanblaufärbung überprüft werden. Dazu wird der Überstand an Kulturmedium abgesaugt, anschließend werden 50 µl Trypanblaulösung zugegeben. Die Zellen werden dann unter dem Lichtmikroskop untersucht. Bei Trypanblaufärbung finden sich auch nach Wochen nur wenige abgestorbene Zellen.

10

## Beispiel 4

### Herstellung einer Hydroxylapatit-Osteoblastenmischung

Osteoblasten wurden in Medium suspendiert und auf Hydroxylapatit gegeben. In der Kultur hafteten die Zellen an den 15 Hydroxylapatit-Partikeln. Im Elektronenmikroskop zeigte sich eine Adhäsion der Zellen auf der kristallinen Oberfläche. Im Stoffwechseltest zeigte sich ein erhaltener Zellmetabolismus der anhaftenden Zellen.

## Beispiel 5

20

### Herstellung einer Hydroxylapatit-Zement-Fibrin-Matrix

Als fester Bestandteil wurde der Fibrin-Suspension ein Zement aus Hydroxylapatit zugegeben. Dazu wurde zunächst untersucht, ob der in Wasser gelöste Zement sich mit dem Fibrin/Thrombin/Calciumchlorid-Komplex vermischen und als Paste spritzen lässt. Es gelang, die Mischung zu spritzen und sie anschließend zu formen (Primäre Stabilität). Sie be- 25 hielt die gegebene Form und verfestigte sich in Minuten zu einer festen Substanz (Sekundäre Stabilität).

## Beispiel 6

### Herstellung einer Osteoblasten-Fibrin-Calciumphosphat-Zement-Paste

30

#### a) Fibrinogenlösung

66 mg Fibrinogen werden in 1 ml Kulturmedium (αMEM oder Medium 199 oder BGJ-B-Medium) ohne Serumzusatz mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst. ε-Amino-n-capronsäure wird in einer Endkonzentration von 0,1 bis 10% der Fibrinogenlösung zugesetzt.

#### b) Fibrinogen-Osteoblastensuspension

Die Zellkultur wird etabliert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die subkonfluente Zellkultur wird trypsinisiert, in Me- 40 dium suspendiert und zentrifugiert (siehe Beispiel 3). Das Zellpellet wird in 100 µl Medium resuspendiert. Nach Zellzählung werden 20.000 Osteoblasten (Zellpassage 1 bis 3) in 200 µl Fibrinogenlösung suspendiert.

#### c) Calciumphosphat-Thrombin-Calciumchloridlösung

45 1,25 I.E. Thrombin werden in 0,5 ml 40 mM Calciumchloridlösung gelöst. Anschließend wird 1 g Calciumphosphat-Pulver (BoneSource®) zu 0,5 ml der Calciumchlorid-Thrombin-Lösung zugegeben.

#### d) Mischung der Komponenten

50 500 µl Fibrinogen-Osteoblasten-Suspension und 500 µl Calciumphosphat-Thrombin-Calciumchlorid-Lösung werden in eine 1 ml Spritze eingebracht. Die Spritze wird dann etwa 10 Sekunden geschüttelt, wonach jeweils etwa 200 µl in eine Kulturschale oder 48-Well-Platte gespritzt werden. Danach wird 800 µl Kulturmedium BGJ-B mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugegeben. Die Zellen werden, wie oben beschrieben, im Wärme- schrank inkubiert.

55

#### e) Stoffwechseltest MTS (Cell Proliferation Assay)

Der Cell Proliferation Assay der Firma Boehringer Mannheim wurde benutzt. Er beruht auf der Transformation eines Tetrazoliumsalzes MTS zu einem gelbgefärbten Formazan durch die mitochondriale Dehydrogenase. Es handelt sich um einen kalorimetrischen Stoffwechseltest. Die Ansätze beinhalteten 20.000 menschliche Osteoblasten (hOB) pro Ansatz (48-Well), 200 µl Fibrinogenlösung (66 mg/ml) und 200 µg Calciumphosphatpulver (CaP) in 200 µl Calciumchlorid-Thrombin-Lösung. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde 1 ml MTS-Lösung zugegeben. Der Farbumschlag in jeweils 100 µl MTS-Lösung wurde nach drei Stunden photometrisch bestimmt. Die verschiedenen Ansätze und Kontrollen sind in der folgenden Tabelle I wiedergegeben:

65

# DE 199 56 503 A 1

Ansatz	hOB	hOB-Fibrin	Injizierbarer Knochen	hOB-Fibrin OFS	hOB-CaP	Fibrin	CaP
		getrennt	gemischt	gemischt	gemischt		
	1	2	3	4	5	6	7
20.000 hOB	x	x	x	x	x		
200 µl Fibrinogen		x	x	x		x	
200 µg CaP			x		x		x

Ansätze 2 und 4 enthalten die gleichen Komponenten hOB und Fibrin, in Ansatz 2 ungemischt ("getrennt"), in Ansatz 4 als Osteoblasten-Fibrin-Suspension OFS gemischt. Die getrennte Prüfung der Komponenten in einem Ansatz soll zum einen ermöglichen einen negativen oder positiven Effekt auf die Zellen gegenüber der unbehandelten Zellkontrolle (Ansatz 1) oder eine Absorption des Farbstoffs durch das Fibrin zu entdecken. Ist die Zellzahl im Ansatz 2, die parallel kontrolliert wird, gleich zum Ansatz 1 und die Absorption im MTS-Test sinkt, so absorbiert Fibrin den Farbstoff. Sinkt die Zellzahl durch reine Zugabe des Fibrins in den Ansatz mit Zellen, so ist ein toxischer Effekt auf die hOB anzunehmen. Im vorliegenden Fall war die Zellzahl konstant, und Fibrin absorbiert den zu messenden Farbstoff teilweise, ein toxischer Effekt wurde ausgeschlossen. Das heißt auch, daß der geringere Wert für OFS (Ansatz 4) gegenüber der Zellkontrolle (Ansatz 1) nicht nur durch Einbringen der Zellen in das Fibrin, sondern auch durch Absorption zu erklären ist. Die reale Stoffwechselaktivität liegt damit höher als der Extinktionswert angibt.

Die Ergebnisse des Stoffwechseltests sind in folgender Tabelle II gezeigt:

Ansatz	Tag 1	Tag 2	Tag 5	Tag 7
1 hOB	0,31	0,34	0,4	0,48
2 hOB-Fibrin	0,02	0,18	0,07	0,15
3 Injizierbarer Knochen	0	0,07	0,14	0,26
4 OFS	0	0,03	0	0,17
5 hOB-CaP	0,2	0,15	0,22	0,18
6 Fibrin	0	0	0,003	0,03
7 CaP	0	0	0	0

Fig. 2 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

## Beispiel 7

### In vivo-Versuch

Die Gewinnung und Vermehrung der Osteoblasten erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Zellen werden durch Trypsin-Lösung enzymatisch abgelöst. Die Osteoblasten ( $1 \times 10^6$ /ml) werden in einer Fibrinogen-Lösung (66 mg/ml) suspendiert. 500 mg Calciumphosphatzement BoneSource® werden in 0,5 ml Calciumchlorid-Lösung (40 mM) mit 1,25 I.E. Thrombin/ml gelöst. 0,5 ml Fibrinogen-Osteoblasten-Suspension werden mit 0,5 ml Calciumphosphat-Thrombin-Calciumchlorid-Lösung in eine 1 ml-Spritze gefüllt und anschließend subcutan in eine Nacktmäuse injiziert.

Ca. 6 bis 8 Wochen alte Nacktmäuse wurden in einer Narkosekammer mit einem Isofluran®-Sauerstoff-Gemisch (3% Isofluran in 100% O<sub>2</sub>, Flow 4 l/min) betäubt. Unter Aufrechterhaltung der Narkose mit einer Inhalationsmaske (1,5 bis 2 Vol.-% Isofluran in 100% O<sub>2</sub>, Flow 0,5 bis 1 l/min) wurden die Tiere mit Betasodona® abgewaschen, das Operationsgebiet rasiert und steril abgedeckt. Es erfolgte ein ca. 4 mm langer quer verlaufender Hautschnitt im Bereich des Rückens. Der Schnitt wurde mit einer Präparationsschere gespreizt, und es wurde eine Hauttasche geschaffen. Ein Spritzkonus wurde eingeführt und die Paste unter die Haut der Tiere injiziert. Die Paste wurde durch perkutane manuelle Formung zu Längssträngen geformt. Die Wunde wurde mit Einzelknopfnähten verschlossen und ein steriler Wundverband angelegt. Die Dauer des Eingriffs betrug ca. 15 Minuten. Die Wunden der Tiere wurden bis zur gesicherten Wundheilung täglich kontrolliert.

Die Nacktmäuse erhielten schließlich eine letale Dosis CO<sub>2</sub> per inhalationem am 14., 29. und 48. Tag postoperativ. Die Konstrukte wurden mit dem umgebenden Gewebe herauspräpariert, photographiert und danach histologisch und immun-

# DE 199 56 503 A 1

histochemisch aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle III zusammengefaßt:

<b>Maus Nr.</b>	<b>Tag</b>	<b>Form</b>	<b>Festigkeit</b>	<b>Matrixsynthese</b>	<b>Vaskular.</b>
5	1	konstant	druckstabil	Bindegewebe	ja
10	2	konstant	druckstabil	Beg. Knochen	ja
15	3	konstant	druckstabil	Knochengewebe	ja
20	4	konstant	druckstabil	Beg. Knochen	ja

"Vaskular." steht für Vaskularisierung, "Beg. Knochen" steht für beginnende Knochenbildung und beschreibt die Änderung der Morphologie von undifferenziertem Bindegewebe zu differenziertem Knochengewebe.

Die Konstrukte waren größtenkonstant und in der Form unverändert nach 14, 29 und 48 Tagen.

Histologisch fand sich am

- 14. Tag eine Gefäßbeinsprossung und extrazelluläre Bindegewebsmatrix;
- 29. Tag ein Gefäßnetz und beginnende Knochenbildung im Konstrukt;
- 48. Tag ein Gefäßnetz und Knochengewebe.

Grundsätzlich sind die angegebenen Konzentrationen varierbar, um unterschiedliche Qualitäten bezüglich Zelldichte, Festigkeit und Formbarkeit zu erreichen. Eine Anpassung an die lokalen Bedingungen in einem Knochendefekt wie Druckbelastung, Scherkräfte, Volumen ist möglich.

## Patentansprüche

1. Knochenersatzmaterial, umfassend wenigstens folgende Komponenten:
  - a) eine weiche Matrix,
  - b) lebende Zellen,
  - c) eine aushärtende Matrix.
2. Knochenersatzmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die weiche Matrix Fibrin oder Fibringen enthält.
3. Knochenersatzmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die weiche Matrix Thrombin enthält.
4. Knochenersatzmaterial nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die weiche Matrix  $\epsilon$ -Aminocapronsäure enthält.
5. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die weiche Matrix wenigstens eine Substanz enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Chondroitinsulfat, Proteoglykane, Sialoproteine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Nucleinsäuren kodierend für Wachstumsfaktoren oder Hormone.
6. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die weiche Matrix wenigstens eine Substanz enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend biologische Kollagene, Gelatine, Alginate, Agarose, Polysaccharide, synthetisches Kollagen, Hydrogele und visköse Polymere.
7. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein wesentlicher Teil der lebenden Zellen Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen sind.
8. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin lebende gefäßbildende Zellen enthält.
9. Knochenersatzmaterial nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die gefäßbildenden Zellen Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen sind.
10. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die aushärtende Matrix wenigstens eine Substanz enthält, die sich durch Kristallisation zu Hydroxylapatit verbindet.
11. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die aushärtende Matrix nicht-keramischen Hydroxylapatit-Zement enthält.
12. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die aushärtende Matrix PGLA enthält.
13. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sich die aushärtende Matrix innerhalb von 15 Minuten verfestigt.
14. Knochenersatzmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer Mehrfachspritze bestehend aus mehreren Spritzen, die kombiniert sind, oder in einer Komplettspritze mit mehreren Kammern bereitgestellt wird.
15. Verfahren zur Herstellung eines Knochenersatzmaterials umfassend eine weiche Matrix, lebende Zellen und eine aushärtende Matrix, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Merkmale aufweist:
  - a) Bereitstellung von lebenden Zellen,
  - b) Mischen der lebenden Zellen mit einer Zusammensetzung, die Bestandteile zur Bildung einer weichen Matrix enthält, und
  - c) Mischen der lebenden Zellen mit einer Zusammensetzung, die ein aushärtendes Material enthält.

# DE 199 56 503 A 1

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß zunächst die lebenden Zellen mit der Zusammensetzung, die Bestandteile zur Bildung einer weichen Matrix enthält, gemischt werden, und anschließend die in der weichen Matrix eingebetteten lebenden Zellen mit der Zusammensetzung, die ein aushärtendes Material enthält, gemischt werden. 5
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die lebenden Zellen durch eine Knochenbiopsie oder Knochenmarksaspiration gewonnen werden. 5
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die lebenden Zellen vor Schritt b) und c) in vitro kultiviert werden. 10
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Teil der lebenden Zellen Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen sind. 10
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die weiche Matrix durch Inkontaktbringen einer Fibrinogenlösung und einer Thrombinlösung hergestellt wird. 10
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen zunächst in Osteoblastenmedium oder physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gelöst wird. 10
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibrinogenlösung durch  $\epsilon$ -Aminocapronsäure stabilisiert wird. 15
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß zu einer der Zusammensetzungen, mit denen die lebenden Zellen gemischt werden, wenigstens eine Substanz zugegeben wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Chondroitinsulfat, Proteoglykane, Sialoproteine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Nucleinsäuren kodierend für Wachstumsfaktoren oder Hormone. 20
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß zu einer der Zusammensetzungen, mit denen die lebenden Zellen gemischt werden, wenigstens eine Substanz zugesetzt wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend biologische Kollagengele, Gelatine, Alginate, Agarose, Polysaccharide, synthetisches Kollagen, Hydrogele und visköse Polymere. 25
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die aushärtende Matrix durch Lösen von nicht-keramischem Hydroxylapatit-Zement in einer wäßrigen Lösung hergestellt wird. 25
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochenersatzmaterial in eine Mehrfachspritze bestehend aus mehreren Spritzen, die kombiniert sind, oder in eine Komplettspritze mit mehreren Kammern gegeben wird. 30
27. Verwendung von nicht-keramischem Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials. 30

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

35

40

45

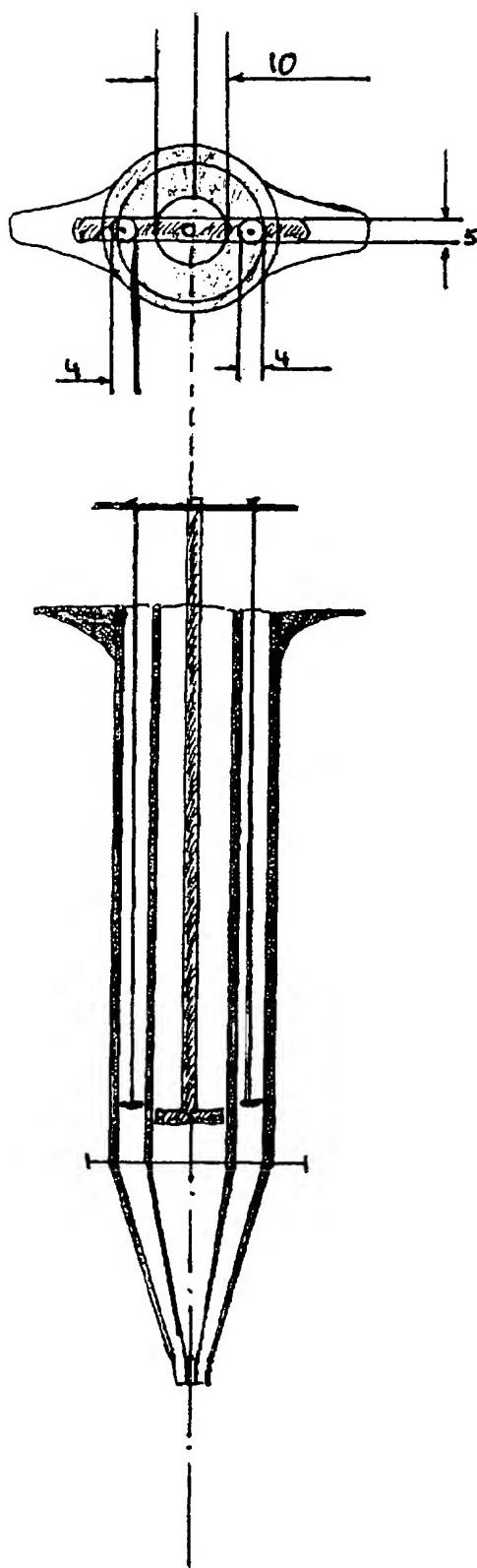
50

55

60

65

**- Leerseite -**

Figur 1

Figur 2

